

Para utilização em diagnóstico *In Vitro*

Complexidade CLIA: Elevada

Aplicação Diagnóstica

O QUANTA Plex™ ENA Profile 5 é um imunoenensaio de fluorescência para a detecção semi-quantitativa de auto-anticorpos Sm, RNP, SS-A, SS-B e Scl-70 em soro humano. A presença destes anticorpos pode ser usada em conjunto com os resultados clínicos e outros exames laboratoriais para auxílio no diagnóstico de lúpus eritematoso sistémico e doenças do tecido conjuntivo relacionadas, tais como a síndrome de Sjögren e esclerodermia.

Resumo e Explicação do teste

Os auto-anticorpos anti-nucleares (ANA) estão presentes numa ampla variedade de doenças do tecido conjuntivo. O teste da presença de ANA em células HEp-2 ou um ANA ELISA actua como um ensaio de despiste sensível.¹ Embora o teste de ANA constitua um excelente teste de despiste para o lúpus eritematoso sistémico (LES), em que um resultado negativo exclui praticamente a presença de LES² activo, este não é, de nenhuma forma, um teste específico. Os testes de acompanhamento são habitualmente efectuados com soros que produzem resultados positivos para ANA. Seis dos auto-anticorpos mais frequentes reagem especificamente com os antigénios nucleares extraíveis Sm, RNP, SS-A 52, SS-A 60, SS-B e Scl-70 (ENAs). Os anticorpos destes ENAs podem contribuir com informação diagnóstica e prognóstica significativa na avaliação de pacientes suspeitos de uma variedade de doenças do tecido conjuntivo, tais como o SLE,² a Síndrome de Sjogren,³ a esclerodermia,⁴ Doença mista do tecido conjuntivo⁵ e a polimiosite.⁶

Têm sido utilizados vários métodos, incluindo ELISA, difusão dupla Ouchterlony, Western Blot e aglutinação passiva para detectar anticorpos contra Sm, RNP, SS-A, SS-B e Scl-70. A técnica de imunoenensaio de fluorescência (FIA) utilizada pelo QUANTA Plex™ ENA Profile 5 é objectiva, semi-quantitativa e pode ser utilizada para testar um grande número de doentes em simultâneo relativamente a cada um destes 5 ENAs, de forma cómoda. São obtidos resultados semi-quantitativos para cada reactividade de auto-anticorpo.

Princípio do método

Sm nativo, RNP e Scl-70 de timo de novilho e SS-B humano recombinado ligam-se, cada um, a esferas diferentes, fluoroscopicamente “coloridas”. Como foi reportado que ambos auto-anticorpos de antígenos SS-A 52 e SS-A 60 são diagnosticamente importantes,⁶ é usado SS-A 60 nativo de timo de novilho e SS-A 52 recombinado em esferas coloridas separadas. As seis esferas revestidas por antigénios diferentes são misturadas em conjunto e colocadas em poços de uma placa de micropoços em condições que conservam os antigénios no seu estado reactivo. São adicionados controlos pré-diluídos e soros de doentes diluídos a micropoços separados, permitindo que os auto-anticorpos Sm, RNP, SS-A 52, SS-A 60, SS-B e Scl-70 presentes se liguem ao antigénio imobilizado. De seguida, é adicionada anti IgG-humana conjugada com uma sonda de fluorescência a cada micropoço. Uma segunda incubação permite ao conjugado anti IgG-humana fluorescente ligar-se a todos os auto-anticorpos do doente que se encontram fixos ao antigénio nas esferas. As amostras são depois medidas no analisador de fluxo Luminex™. Este analisador de fluxo tem capacidade para separar a cor de cada esfera e medir a intensidade da fluorescência do conjugado em cada esfera.⁷ A intensidade da fluorescência conjugada é proporcional à quantidade de anti-IgG humana marcada fixa aos auto-anticorpos do doente na esfera. Cada antigénio pode ser semi-quantificado comparando a intensidade de fluorescência da amostra do doente com a fluorescência do Calibrador correspondente. Uma esfera de controlo revestida por anti-IgG está incluída em cada micropoço para garantir que se detectam os resultados falsos negativos decorrentes de erros de operação.

Reagentes

1. Placa de micropoços de poliestireno, 12 (1 x 8) tiras de micropoços com suporte, contendo esferas de 7 cores diferentes. Cada uma das esferas coloridas está revestida com um antigénio purificado diferente (Sm, RNP, SS-A 52, SS-A 60, SS-B, Scl-70 e um controlo anti-IgG), numa embalagem de folha de alumínio contendo excipientes
2. QUANTA Plex™, 1 frasco de tampão contendo conservante e soro humano sem anticorpos IgG humanos contra antigénios no ENA Perfil 5, pré-diluído, 1,2mL
3. ENA Profile 5 Calibrator, 1 frasco de tampão contendo conservante e anticorpos de soro humano contra os antigénios Sm, RNP, SS-A 52, SS-A 60, SS-B e Scl-70, pré-diluído, 1,2mL
4. ENA Perfil 5 Positive, 1 frasco de tampão contendo conservante e anticorpos de soro humano contra os antigénios Sm, RNP, SS-A 52, SS-A 60, SS-B e Scl-70, pré-diluído, 1,2mL
5. Diluente para Amostras HRP, 1 frasco de cor rosa, contendo solução salina com tampão Tris, Tween 20, estabilizadores proteicos e conservantes, 50mL
6. Conjugado IgG marcado com fluorescência (cabra), anti-IgG humana (específica para fc), 1 frasco castanho – pó liofilizado, contendo tampão, estabilizadores proteicos e conservantes. Consulte a secção de Métodos para as instruções de reconstituição.
7. QUANTA Plex™ Conjugate Diluent, 1 frasco – de cor rosa, contendo tampão, estabilizadores proteicos e conservantes, 7mL

Advertências

1. ADVERTÊNCIA: Este produto contém um químico (0,02% cloranfenicol) no diluente da amostra considerado como cancerígeno no Estado da Califórnia.
2. Todo o material de origem humana utilizado na preparação dos controlos deste produto foi testado e deu resultados negativos para métodos aprovados pela FDA para anticorpos anti HIV, HBsAg e HCV. Contudo, nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência de HIV, HBV, HCV ou outros agentes infecciosos. Assim, o ENA Profile 5 Calibrator e Positive e o Controlo negativo devem ser manipulados como se fossem material potencialmente infeccioso.⁸
3. A azida de sódio é utilizada como conservante. Este produto é venenoso e pode ser tóxico se for ingerido ou absorvido pela pele ou pelos olhos. A azida de sódio pode reagir com componentes de chumbo ou cobre das canalizações formando azidas metálicas explosivas. Por esta razão, ao deitar fora os restos de reagentes é necessário deixar correr água em quantidade abundante para evitar a formação destas substâncias.
4. Usar equipamento de protecção apropriado para trabalhar com os reagentes.
5. Os salpicos de reagentes devem ser limpos imediatamente. Observar todas as regulamentações ambientais nacionais e locais relativas à eliminação de resíduos.

Precauções

1. Utilizar somente para diagnóstico *In Vitro*.
2. A substituição de componentes do dispositivo por outros que não pertençam a este sistema pode originar resultados inconsistentes. Todos os controlos são específicos para o número de lote do kit.
3. A adaptação, total ou parcial, deste teste para processadores automatizados e outros aparelhos de processamento de líquidos pode dar origem a diferenças nos resultados obtidos nos testes por técnica manual. É da responsabilidade de cada laboratório garantir que o seu procedimento automático dá origem a resultados dentro dos limites aceitáveis.
4. Existem vários factores que influenciam o desempenho do ensaio. Entre estes inclui-se a temperatura inicial dos reagentes, a temperatura ambiente, a precisão e reprodutibilidade da técnica de pipetagem, a reprodutibilidade da técnica de mistura, o analisador de fluxo Luminex™ utilizado para ler os resultados e a duração dos tempos de incubação durante o ensaio. É necessária especial atenção à consistência para se obterem resultados rigorosos e reprodutíveis.
5. O protocolo deve ser criteriosamente respeitado.
6. Uma selagem inadequada da saqueta com tiras de micropoços e dessecantes pode provocar a degradação do antigénio e baixa precisão dos resultados.
7. Pode ser observada uma fluorescência inaceitavelmente baixa depois de múltiplas utilizações de um único frasco de conjugado de fluorescência durante algum tempo. É importante cumprir todos os procedimentos recomendados para manipulação dos conjugados fluorescentes, visando prevenir esta ocorrência.
8. A contaminação química do conjugado fluorescente pode resultar de uma limpeza ou lavagem inadequadas do equipamento ou instrumentos. Resíduos de substâncias químicas vulgares de laboratório tais como formalina, lixívia, etanol ou detergente irão provocar degradação do conjugado fluorescente no decurso do tempo. Lave exaustivamente todo o equipamento ou instrumentos com água destilada ou desionizada depois da utilização de desinfectantes/produtos de limpeza químicos.

Precauções particulares de conservação

1. Conservar todos os reagentes a 2-8° C. Não congelar. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando armazenados e manipulados conforme descrito no protocolo.
2. As tiras dos micropoços revestidas com antigénios que não forem logo utilizadas, devem ser seladas na embalagem protectora original com dessecantes e conservadas a 2-8° C.

Colheita da amostra

Este procedimento deve ser efectuado com uma amostra de soro. A adição de azida ou de outros conservantes às amostras do teste pode interferir negativamente nos resultados. As amostras de soro com contaminação bacteriana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Amostras ou soro muito hemolizados ou lipémicos devem ser evitados.

Após a colheita, o soro deve ser separado do coágulo. O documento H18-A3 da CLSI (anteriormente NCCLS) recomenda as seguintes condições de armazenamento para as amostras: 1) Não armazenar as amostras à temperatura ambiente durante mais de 8 horas. 2) Se o teste não for concluído num prazo de 8 horas, guardar a amostra a 2-8° C. 3) Se o teste não for concluído num prazo de 48 horas, ou se houver transporte da amostra, congelar a -20° C ou a uma temperatura inferior. As amostras congeladas devem ser bem agitadas depois de descongelarem e antes de serem testadas.

Procedimento

Material fornecido

- 1 Placa de micropoços de ENA Profile 5, (12-1 x 8 poços), com suporte
- 1 1,2 mL QUANTA Plex™ Negative Control, pré-diluído
- 1 1,2 mL ENA Profile 5 Calibrator, pré-diluído, pronto a utilizar
- 1 1,2 mL ENA Profile 5 Positive, pré-diluído, pronto a utilizar
- 1 50 mL Diluente da amostra HRP

- 1 Conjugado IgG marcado com fluorescência (cabra), anti-IgG humana (específica para fc)
- 1 7 mL QUANTA Plex™ Conjugate Diluent

Material adicional necessário mas não fornecido

Fluido de preservação de analisador de fluxo Luminex™

Micropipetas de 5 e 500 µL

Pontas descartáveis para as micropipetas

Tubos de teste para diluições de amostras de doentes, volume de 1-4 mL

Água destilada ou desionizada

Analisador de fluxo Luminex™

Pipetador electrónico de 8 canais para a dispensa de 5, 30, 45, 50 e 60µL ou dispositivo de pipetagem/diluição automatizado

Utilização do Analisador de Fluxo Luminex™

1. Consulte o manual do utilizador fornecido com o Luminex™ para instruções detalhadas sobre o funcionamento do analisador de fluxo Luminex™ Versão Sistema Integrado (IS) do programa de software do Luminex™ ou Versão 2,0 ou superior. Os dados para o ENA Profile 5 foram obtidos utilizando IS Versão 1,7 e 2,2.329. Para mais informações e para a resolução de problemas com este ensaio, contacte a assistência técnica da INOVA Diagnostics, Inc. na morada ou número de telefone presentes na última página do Folheto Informativo. Seguem-se instruções resumidas para funcionamento do analisador de fluxo Luminex™.
2. calibre o Luminex™ utilizando as esferas de Controlo e Calibração fornecidas pela Luminex Corporation pelo menos uma vez por mês e confirme que a calibração tem sucesso. Para além disso, calibre o Luminex™ se a temperatura de calibração delta for superior a 3 graus, se os controlos do ensaio estiverem fora do intervalo ou conforme for necessário.
3. Luminex™ demora 30 minutos a aquecer depois de ter sido ligado. Quando o período de aquecimento se concluir, efectue as operações de purga, irrigação com álcool e lavagem recomendadas pelo fabricante.
4. Utilizar a Versão do software IS, carregue o modelo "ENA Profile 5" e assegure-se de que todas as informações de lote estão correctas. Se for necessário, actualize as informações do lote. Os parâmetros no modelo são os seguintes: As cores das esferas SS-A 52 = 19, SS-A 60 = 17, SS-B = 7, Sm = 8, RNP = 9, Scl-70 = 11, anti-IgG - 42. Os eventos por esfera são 50, o tamanho da amostra para 50 µL, o débito para 60 µL/minuto (rápido) e o portão para aproximadamente 7500 a 17000, Utilizam-se os valores medianos para a Intensidade Média de Fluorescência (MFI).
5. Introduza os nomes da amostra manualmente, ou clicando em "Load Pa List".
6. Carregue a placa na plataforma XY do Luminex™.
7. Faça funcionar o Luminex™ clicando no botão "Start Plate".
8. Quando terminar o dia, execute as operações de sanear e embeber antes de desligar o instrumento.

Método

Antes de iniciar

1. Para programar informações para o equipamento automatizado, contacte a Assistência Técnica da INOVA Diagnostics.
2. Ligue o analisador de fluxo Luminex™, assegure-se de que aqueceu e efectue todas as operações de manutenção diárias conforme previamente descrito. Se for necessário, calibre o instrumento e confirme que a calibração teve sucesso.
3. Coloque todos os reagentes e amostras do doente à temperatura ambiente (20-26°C) e misture bem.
4. Se o conjugado fluorescente de anti-IgG humana não tiver sido reconstituído, adicione 6mL de QUANTA Plex™ Conjugate Diluent ao frasco castanho contendo o pó liofilizado e rode o recipiente durante aproximadamente 30 segundos para dissolver o conteúdo. O conjugado fluorescente reconstituído permanece estável durante 3 meses entre 2 e 8°C. **Não congele.**
5. Certifique-se de que o recipiente do fluido de preservação no Luminex™ está cheio de fluido de protecção disponível na Luminex Corporation.
6. Prepare uma diluição a 1:101 de cada amostra do doente adicionando 5µL de cada soro a 500µL de Diluente para Amostras HRP, e depois coloque no vórtice para misturar exaustivamente a solução. As amostras diluídas devem ser utilizadas no prazo de 8 horas depois da preparação. **NÃO DILUA** o QUANTA Plex™ Negative Control e ENA Profile 5 Low e High Positives.
7. A determinação da presença ou ausência de anticorpos Sm, RNP, SS-A 52, SS-A 60, SS-B e Scl-70 utilizando unidades arbitrarias necessita de um micropoço para cada um dos controlos negativos e elevados positivos controlos e dois micropoços para o Calibrador, e um micropoço para cada amostra do doente. Recomenda-se a execução das amostras em singleto.

Técnica

1. **Todos os reagentes devem ser colocados à temperatura ambiente (20-26°C) antes de começar o ensaio.** Coloque o número necessário de micropoços/tiras no suporte. **Volte imediatamente a colocar as tiras não utilizadas no saco contendo exsiccantes e vede com firmeza para minimizar a exposição a vapor de água e luz.**

2. Adicionar 45µL de Diluente de Amostra HRP a cada micropoço que contenha uma amostra do doente. **Não** adicionar Diluente de Amostra HRP aos quatro primeiros micropoços, uma vez que estes contêm o Controlo Negativo QUANTA Plex™, O Calibrador ENA Profile 5 (em duplicado) e o Controlo Positivo ENA Profile 5. **Não** adicione as amostras dos doentes diluídas aos micropoços neste momento.
3. Mantenha um das seguintes sequências de coordenação quando adicionar controlos, amostras e conjugado ao micropoços. Em virtude das amostras serem lidas sucessivamente, a uma taxa de aproximadamente 1 amostra a cada 19 segundos (ou uma tira de 8 poços em aproximadamente 2½ minutos) pelo Luminex™, as amostras dos doentes e também o conjugado devem ser adicionados aos micropoços a esta taxa, para minimizar qualquer variação da frente para trás do ensaio. Se os controlos, amostras ou o conjugado forem adicionados um de cada vez, proteja a adição destes ao próximo micropoço em 19 segundos. Se os controlos, amostras ou o conjugado forem adicionados 8 de cada vez a uma tira, proteja cada adição à tira seguinte 2½ minutos. Estes dois esquemas de coordenação irão demorar aproximadamente 30 minutos para a adição de amostras a todas as 12 tiras de uma placa inteira e irão minimizar a variação da frente para trás do ensaio.
4. Submeter ao Vórtice, e depois adicionar 50µL de cada um dos seguintes: o Controlo Negativo QUANTA Plex™ **pré-diluído** ao primeiro micropoço, o Calibrador ENA Profile 5 no segundo e no terceiro micropoços e o Controlo Positivo ENA Profile 5 no quarto micropoço. Tem que ser utilizada uma pipeta electrónica quando se adicionarem manualmente as amostras e se misturarem as esferas. Utilize uma das sequências de coordenação para adicionar os controlos conforme descrito o passo 3. **Pipete vigorosamente pelo menos 30 µL do C QUANTA Plex™ Negative Control, ENA Profile 5 Calibrator e Positive Control para cima e para baixo quatro vezes, para misturar as esferas e os controlos em cada micropoço.** O tempo de incubação de 30 minutos inicia-se depois de adicionar o QUANTA Plex™ Negative Control, ao **primeiro** micropoço.
5. Prossiga imediatamente com o ensaio adicionando 5 µL de soro do doente diluído aos micropoços adequados (nota: tal produz uma diluição final a 1:1010 do soro do doente). Mantenha a mesma sequência de coordenação utilizada no passo 4. **Misture a amostra do doente diluída e o Diluente para Amostras no micropoço pipetando vigorosamente pelo menos 30 µL dos conteúdos do micropoço para cima e para baixo quatro vezes.** Prossiga com a coordenação da incubação durante 30 minutos a partir do momento da adição do Controlo Negativo. Coloque a tira de micropoços à temperatura ambiente, numa superfície nivelada e afastada da luz solar directa durante o resto do período de incubação.
6. No final do primeiro período de incubação, adicione 50 µL do conjugado fluorescente a cada micropoço e **pipete vigorosamente pelo menos 60 µL do conteúdo do micropoço para cima e para baixo quatro vezes.** Para adicionar o conjugado, mantenha a mesma sequência de coordenação utilizada nos passos 4 e 5. O conjugado deve ser removido do frasco em condições assépticas padrão e utilizando boas técnicas de laboratório. Retire apenas do frasco a quantidade de conjugado necessária para o ensaio. **PARA EVITAR POTENCIAL CONTAMINAÇÃO MICROBIANA E/OU QUÍMICA, NUNCA VOLTE A COLOCAR CONJUGADO NÃO UTILIZADO NO FRASCO.** Incube as tiras de micropoços durante 30 minutos à temperatura ambiente, numa superfície nivelada e afastada da luz solar directa. O período de incubação inicia-se depois da **primeira** adição do conjugado.
7. No prazo de uma hora depois da conclusão da incubação de 30 minutos do conjugado fluorescente, leia a placa de ENA Perfil 5 no Luminex™ conforme detalhado na secção acima, "Utilização do Citómetro de Fluxo Luminex™".

Controlo de qualidade

1. O Positivo baixo ENA Profile 5 Calibrador e Positivo Controlo e QUANTA Plex™ Negative Control devem ser processados com todos os lotes de amostras para garantir que todos os reagentes e procedimentos actuam correctamente.
2. Uma vez que o Positivo baixo ENA Profile 5 Calibrador e Positivo Controlo e QUANTA Plex™ Negative Control se encontram pré-diluídos, estes não controlam o procedimento associado à diluição das amostras.
3. Outros controlos podem ser testados de acordo com as directivas ou requerimentos locais e/ou nacionais ou de acordo com as disposições de organizações acreditadas. Outros controlos adequados podem ser preparados efectuando alíquotas de amostras de soro humano e conservando a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
4. Para que os resultados dos testes possam ser considerados válidos, devem ser cumpridos todos os critérios a seguir definidos. Se algum não for cumprido, o teste deve ser considerado inválido e o ensaio repetido. O valor, em Unidades de Luminex (UL), do Calibrador para cada antigénio está indicado no rótulo da caixa para esse kit. Consulte a fórmula na secção de Cálculo dos Resultados para determinar as ULs do QUANTA Plex™ Negative Control e do controlo Positivo Alto.
 - a. O valor do QUANTA Plex™ Negative Control deve ser <20 UL em cada um dos 5 antígenos, e entre 10 e 50 UL no grânulo do anti-IgG.
 - b. O valor do Perfil de ENA 5 Positivo Alto deve ser ≥ 100 e ≤ 300 UL em cada um dos 5 antígenos, e entre 10 e 50 UL no grânulo do anti-IgG.
 - c. A esfera de controlo anti-IgG destina-se a garantir que se detectam os resultados falsos negativos dos doentes, decorrentes de erros de operação. Existe a possibilidade do amostra do doente e/ou conjugado não ter sido adicionado ao poço da amostra do doente se a esfera de anti-IgG da amostra do doente for inferior à 3UL. Neste caso, o doente deve ser novamente testado para confirmar o resultado negativo.

- O QUANTA Plex™ Negative Control e ENA Profile 5 Calibrador e o Positivo alto controlo servem para monitorizar falhas substanciais dos reagentes. O Positivo alto ENA Profile 5 não garante precisão no ponto de decisão do teste. O utilizador deve recorrer ao documento C24-A3 da CSLI (anteriormente NCCLS) para obter instruções suplementares sobre as práticas do Controlo de Qualidade apropriadas.
- Se desejado, bem com Diluente de Amostra HRP mas nenhum serum pode ser funcionado para confirmar que o grânulo do controle do anti-IgG detectará bem com nenhum serum. Este controlo isento de soro deve ser < 3,0 LU na esfera Anti-IgG e negativo em todas as outras esferas.

Cálculo dos resultados

As MFIs para todos os controlos e amostras do doente para cada antigénio são determinadas em primeiro lugar. A reactividade, em UL, de uma determinada amostra para cada tipo de antigénio pode ser depois calculada através da fórmula que se segue. Divida a MFI da amostra pela MFI do ENA Perfil 5 Calibrador para esse antigénio e multiplique o resultado pelo número de UL atribuído ao Perfil de ENA 5 Calibrador para esse antigénio. A UL do Calibrador para cada antigénio está indicada no rótulo da caixa para esse lote do kit. O exemplo seguinte destina-se a determinar a reactividade anti-Sm. Utilize a fórmula equivalente para cada um dos outros antigénios.

$$\text{Valor da amostra (em UL)} = \frac{\text{MFI da Amostra para Sm}}{\text{MFI Calibrador para Sm}} \times \text{Valor do Calibrador para Sm (em UL)}$$

A amostra pode ser depois classificada de acordo com o quadro abaixo.

	UL
Negativa	< 20
Positiva fraca	20-49
Positiva moderada	50-100
Positiva forte	> 100

A reactividade está relacionada com a quantidade de auto-anticorpo presente na esfera, de forma não linear. Embora aumentos e diminuições das concentrações de anticorpos dos doentes se reflectam num aumento ou diminuição correspondentes da reactividade da fluorescência, a alteração não é proporcional (ou seja, uma duplicação da concentração de anticorpos não se reflecte numa duplicação da reactividade). Para além disso, a quantidade total de IgG no soro de um doente afecta a MFI determinada. Caso seja necessária uma quantificação mais rigorosa dos auto-anticorpos do doente, a amostra deve ser submetida a um teste quantitativo.

Interpretação dos resultados

A FIA consiste numa técnica extremamente sensível e tem capacidade para detectar pequenas diferenças em populações de doentes. Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo do normal com base nas suas técnicas, controlos, equipamento e população de doentes, de acordo com os seus procedimentos estabelecidos.

Sugere-se que os resultados reportados pelo laboratório devam incluir a declaração: “Os resultados que se seguem foram obtidos com o INOVA QUANTA Plex™ ENA Profile 5. Valores obtiveram com métodos de ensaio de outros fabricantes não podem ser utilizados em substituição. A magnitude dos níveis de auto-anticorpos IgG reportados nem sempre pode estar correlacionada com um título de parâmetro de avaliação final.”

Limitações do método

- A presença de imuno complexos ou de outros agregados de imunoglobulinas na amostra do doente podem causar um aumento do nível de ligação não-específica e produzir resultados falsos positivos neste ensaio.
- Nem todos os doentes com SLE, com o síndrome de Sjogren ou de escleroderma são Sm, RNP, SS-A 52, SS-A 60, SS-B ou Scl-70 positivos.
- Os resultados deste ensaio devem ser utilizados em conjunto com as conclusões clínicas e outros testes serológicos.
- Não agitar adequadamente os controlos e/ou as amostras de soro diluídas, com as microesferas conservados na placa, pode aumentar os valores de %CV, em relação aos valores típicos encontrados nos testes ELISA.
- Depois da meia-hora de incubação com o conjugado fluorescente, ocorre um aumento de fluorescência de aproximadamente 10% por cada meia hora adicional ao tempo de incubação.
- As características de desempenho do ensaio não foram determinadas para outras matrizes além do soro.
- A falha na manutenção dos tempos de adição dos reagentes pode provocar um aumento “Front-to-back” das variações dos testes.

Valores esperados

A capacidade do teste QUANTA Plex™ ENA Profile 5 para detectar anticorpos Sm, RNP, SS-A 52, SS-A 60, SS-B e Scl-70 foi avaliada mediante comparação com testes ELISA disponíveis no mercado, comercializados pela INOVA Diagnostics, Inc. Os resultados dos ELISAs e de cada um dos testes de Perfil 5 QUANTA Plex™ ENA foram considerados positivos se a amostra do paciente tiver sido igual ou superior a 20 Unidades Luminex e negativos se tiverem sido inferiores a 20 UL.

Intervalo de valores normais

Analisaram-se 168 amostras de doadores de sangue saudáveis no teste QUANTA Plex™ ENA Perfil 5. 158 amostras normais foram negativas na parte SS-A 52 do teste QUANTA Plex™. A amostra mais elevada apresentou um valor de 49 UL. O valor médio foi de 3,8 UL com um desvio padrão (DP) de 4,9. O cutoff foi de 3,3 DP acima da média.

159 amostras normais foram negativas na parte SS-A 60 do teste QUANTA Plex™. A amostra mais elevada apresentou um valor de 31 UL. O valor médio foi de 2,5 UL com um DP de 2,8. O cutoff foi de 6,3 DP acima da média.

159 amostras normais foram negativas na parte SS-B do teste QUANTA Plex™. A amostra mais elevada apresentou um valor de 82 UL. O valor médio foi de 3,4 UL com um DP de 6,8. O cutoff foi de 2,4 DP acima da média.

Todas as 160 das amostras normais foram negativas na parte Sm do teste QUANTA Plex™. O valor médio foi de 2,6 UL com um desvio padrão (DP) de 2,4. O cutoff foi de 7,2 DP acima da média.

Tudo 160 amostras normais foram negativas na parte RNP do teste QUANTA Plex™. O valor médio foi de 2,3 UL com um desvio padrão (DP) de 2,4. O cutoff foi de 7,4 DP acima da média.

157 amostras normais foram negativas na parte Scl-70 do Teste QUANTA Plex™. A amostra mais elevada apresentou um valor de 48 UL. O valor médio foi de 5,5 UL com um DP de 4,7. O cutoff foi de 3,1 DP acima da média.

Comparação entre os Ensaios QUANTA Plex™ e ELISA

Para determinar o acordo positivo e negativo dos testes em amostras de paciente clinicamente definido, foram testados 288 pacientes com SLE, síndrome de Sjögren ou esclerodermia com a técnica de Perfil 5 do QUANTA Plex™ ENA e os 5 ELISAs correspondentes.

SLE, SS and Scl n=288	INOVA ENA Profile 5 (Sm)		
Sm ELISA 96,2 o mesmos		Negativa	Positiva
	Negativa	244	4*
	Positiva	7**	33

*2 eram positivas baixas e 2 eram positiva moderada.

**6 eram positivas baixas e 1 era positiva moderada.

SLE, SS and Scl n=284^	INOVA ENA Profile 5 (RNP)		
RNP ELISA 94,0% o mesmos		Negativa	Positiva
	Negativa	203	0
	Positiva	17*	64

^4 amostras não foram testadas devido a volume insuficiente.

**11 eram positivas baixas, 2 eram moderadas e 4 eram altas.

SLE, SS and Scl n=288	INOVA ENA Profile 5 (SS-A 52 e SS-A 60)		
SS-A ELISA 97,6% o mesmos		Negativa	Positiva
	Negativa	205	2*
	Positiva	5**	27

*Ambos eram positivas baixas. 1 era positivas baixas, 4 eram moderada positiva.

SLE, SS and Scl n=288	INOVA ENA Profile 5 (SS-B)		
SS-B ELISA 97,9% o mesmos		Negative	Positive
	Negative	255	1*
	Positive	5**	76

*Este foi um positivo baixo. **4 eram positivas baixas e 1 era moderada.

SLE, SS and Scl n=288	INOVA ENA Profile 5 (Scl-70)		
Scl-70 ELISA 96,2% o mesmos		Negativa	Positiva
	Negativa	241	1*
	Positiva	10**	36

*Este foi um positivo baixo. **7 eram positivas baixas, 2 eram moderada e 1 era elevado.

Positiva, Negativa e Total Por cento Do Acordo

Todos os dados acima, mais os dados dos pacientes com artrite reumatóide, foram usados para calcular a sensibilidade relativa de cada teste QUANTA Plex™ em relação ao ELISA correspondente.

Todas as amostras N=527	Ambos Neg	Ambos Pos	ELISA Neg Q.Plex Pos	ELISA Pos Q.Plex Neg	Sensibilidade Relativa	Especificidade Relativa	Por cento Do Acordo
Sm	416	33	4	7	83%	99%	97,6%
RNP*	374	64	0	18	78%	100%	96,1%
SS-A	375	76	4	5	94%	99%	98,0%
SS-B	426	27	2	5	84%	99%	98,5%
Scl-70	409	38	2	11	78%	99%	97,2%

*N = 456 para RNP, 4 amostras não foram testadas ele ELISA devido a volume insuficiente.

Precisão e Reprodutibilidade

Varição inter-ensaio e variação intra-ensaio. Para a variação inter-ensaio, analisaram-se várias amostras em 6 testes executados em dias diferentes. No quadro abaixo apresenta-se a variação em duas amostras diferentes para cada especificidade de teste. Para a variação intra-ensaio, foram analisadas várias amostras 8 vezes cada num único ensaio. No quadro abaixo apresenta-se a variação em duas amostras diferentes para cada especificidade de teste.

Variação inter-ensaio			Variação intra-ensaio		
Antígeno	Média UL	% C.V.	Antígeno	Média UL	% C.V.
SS-A 52	32	17%	SS-A 52	33	14%
SS-A 52	173	19%	SS-A 52	163	4%
SS-A 60	26	8%	SS-A 60	26	13%
SS-A 60	203	5%	SS-A 60	202	2%
SS-B	27	12%	SS-B	28	11%
SS-B	266	10%	SS-B	275	1%
Sm	29	8%	Sm	28	8%
Sm	209	12%	Sm	216	6%
RNP	39	4%	RNP	40	4%
RNP	144	9%	RNP	156	4%
Scl-70	26	11%	Scl-70	26	11%
Scl-70	202	9%	Scl-70	199	5%

Referências

1. von Muhlen CA and Tan E: Autoantibodies in the Diagnosis of Systemic Rheumatic Diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **24**: 323-358, 1995.
2. Tan EM, et al.: The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **25**: 1271-1277, 1982.
3. Jonsson R, Haga HJ and Gordon TP: Current concepts on diagnosis, autoantibodies and therapy in Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol* **29**: 341-348, 2000.
4. Walker JG and Fritzler MJ: Update on autoantibodies in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* **19**:580–591, 2007.
5. Amigues JM, Cantagrel A, Abbal M and Mazieres B: Comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue disease in patients with anti-RNP antibodies. *Autoimmunity Group of the Hospitals of Toulouse. J Rheumatol* **23**: 2055-2062, 1996.
6. Frank MB, V McCubbin, E Trieu, Y Wu, DA Isenberg, IN Targoff. The association of anti-Ro52 autoantibodies with myositis and scleroderma autoantibodies. *J Autoimmun* **12**:137-142, 1999.
7. Martins TB, Burlingame R, von Muhlen CA, et al. Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**:1054-1059, 2004.
8. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, Fifth Edition, 2007.

Fabricado por:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Representante Autorizado:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

Technical Service
628920PRT

888-545-9495
November 2009
Revision 9

